

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



(Translation)

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

RECEIVED

MAY 08 2002

TECH CENTER 1600/2900

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

Date of Application: November 21, 2000

Application Number: Japanese Patent Application
No. 2000-354396

Applicant(s): NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL
SCIENCE AND TECHNOLOGY

January 29, 2002

Commissioner,
Patent Office

Kozo OIKAWA (seal)

Certificate No. 2002-3002317



日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年11月21日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-354396

[ST.10/C]:

[JP2000-354396]

出 願 人

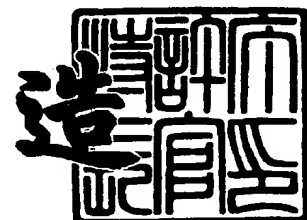
Applicant(s):

独立行政法人産業技術総合研究所

2002年 1月29日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2002-3002317

【書類名】 特許願

【整理番号】 11900381

【提出日】 平成12年11月21日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/09
C12N 11/16

【発明の名称】 融合遺伝子発現ベクター及び固定化酵素の製造方法

【請求項の数】 4

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院 生命工学
工業技術研究所内

【氏名】 安部 博子

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院 生命工学
工業技術研究所内

【氏名】 新聞 陽一

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院 生命工学
工業技術研究所内

【氏名】 地神 芳文

【特許出願人】

【識別番号】 000001144

【氏名又は名称】 工業技術院長 梶村 皓二

【指定代理人】

【識別番号】 220000404

【氏名又は名称】 工業技術院 生命工学工業技術研究所長 大箸 信一

【代理関係の特記事項】 特許出願人 工業技術院長の指定代理人

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 融合遺伝子発現ベクター及び固定化酵素の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の (a) 又は (b) の酵母細胞壁タンパク質をコードする遺伝子の下流に、異種タンパク質をコードする遺伝子を結合させてなる融合遺伝子を含むことを特徴とする、融合遺伝子発現ベクター。

(a) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質

(b) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ酵母細胞壁への局在及び固定化能を有するタンパク質

【請求項 2】 異種タンパク質が、糖転移酵素タンパク質である請求項 1 に記載の融合遺伝子発現ベクター。

【請求項 3】 請求項 1 に記載の融合遺伝子発現ベクターにて形質転換された形質転換酵母。

【請求項 4】 請求項 3 に記載の形質転換酵母を培養し、融合遺伝子を酵母細胞壁表層に発現させ、異種タンパク質が細胞壁に固定化されている酵母を取得することを特徴とする、固定化酵素の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、酵母細胞壁への局在及び固定化能を有する P i r (protein internal repeat) タンパク質を所望の異種タンパク質の N-末端に結合させた融合タンパク質の形で酵母細胞壁表層に発現させるための融合遺伝子発現ベクター、及び当該発現ベクターにて酵母を形質転換し、異種タンパク質が細胞壁に固定化されている酵母を取得することを特徴とする固定化酵素の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

バイオリアクター等で物質生産のために使用される酵素タンパク質は、操作の利便性や経済的観点から、一般には不溶性担体に固定化して固定化酵素として利

用される。固定化酵素の製造法としては、酵素タンパク質を精製し、樹脂ビーズ等に固定化する方法が一般的である。しかし、酵素タンパク質の大量精製は操作が煩雑であるばかりでなく、コストもかかり、また精製過程で酵素活性が失活する可能性がある。さらに樹脂ビーズ等の担体に固定化する過程で酵素活性が失活する可能性もあり得る。また、酵素タンパク質を生産する細胞をそのまま固定し、固定化酵素として使用する例もあるが、この場合、酵素タンパク質は細胞内部にあり、酵素反応の効率が最適とは言えない。従って、酵素タンパク質を担体となる細胞表面に局在化させることが望ましい。

【0003】

細胞膜タンパク質の膜への結合様式のひとつとして、糖脂質である GPI (glycophosphatidylinositol) がタンパク質の C 末端に結合し、その脂質部分が膜内に埋もれてタンパク質を膜につなぎとめる形 (GPI アンカー) が存在することが知られている [Conzelmannら、EMBO J., 7, 2233-2240 (1988)]。この GPI アンカーを有する膜タンパク質 (GPI アンカータンパク質) の細胞壁への固定化は、まずタンパク質合成過程の小胞体においてタンパク質の C-末端部分が切断除去され、そこに GPI アンカーが付加された後、ゴルジ体において GPI コア糖鎖の修飾を受けて細胞膜まで輸送され、そこで細胞壁グルカンにタンパク質部分が転移され、細胞壁に共有結合されることによって行われることが報告されている [Lu, J. Cell, Biol., 128, 333-340 (1995)]。

【0004】

従って、GPI アンカーは細胞表層にタンパク質を固定化する手段として有用であり、GPI アンカーを利用して異種タンパク質を細胞壁に固定化する技術も確立している [Muraiら、Appl Microbiol Biotechnol 51, 65-70 (1999)]。しかしながら、GPI アンカーの欠点は、GPI アンカーシグナルがタンパク質の C-末端に融合した場合には細胞壁への局在化と固定に機能するが、タンパク質の C-末端に融合しなければ機能しないことである [Lipkeら、Mol. Cell Biol., 9, 3155-3165 (1989)]。かかる欠点を回避する方法として、GPI アンカーにより細胞壁に固定化した AGA1p [Royら、Mol Cell Biol., 11, 4196-4206 (1991)] に、AGA2p [Cappellaroら、EMBO J., 10, 4081-4088 (1991)] を

N-末端側に融合したタンパク質をS-S結合を介して固定化するGPIの変法が報告されている [Boder and Wittrup, *Nature Biotechnol.*, 15, 553-557 (1997)]。しかしながら、この方法はAGA1pを発現した細胞にしか適応できない。

【0005】

一方、ヒトのホルモンや生理活性物質の多くや、これらの生理活性物質の受容体はタンパク質とそれに付加された糖鎖で構成されている。

この糖鎖部分は、生理活性に重要な働きを果たし、タンパク質本体だけでは得られない [木幡陽, 蛋白質核酸酵素, 36, 775-788 (1991)]。糖転移酵素は、この糖鎖構造形成に必須な酵素であり、ヒトでは数百種類あると考えられており、微生物や植物の糖転移酵素を含めれば、その種類は膨大なものとなる。糖転移酵素は、その基質特異性が極めて高く、特定の構造の受容体糖鎖に特定の糖を特定の結合様式で付加し、特定の構造の糖鎖を合成する [Qwensら, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 109, 1075-1082 (1982); Betteridge, *Eur. J. Biochem.*, 132, 29-35 (1983)]。よって、糖鎖の構造は、多種類の糖が枝分かれを含む多様な結合様式で結合した無限の構造の多様性をもっており、その構造の多様性は様々な糖転移酵素の基質特異性の組み合わせで決まる。したがって、複合糖質を生産利用する際、糖鎖構造を正確に制御しないかぎり、生体内で機能する物質を製造できないため、必要な構造を合成する糖転移酵素を効率よく発現し調製する必要がある。

【0006】

大半の糖転移酵素はII型膜タンパク質で、C-末端側の活性領域がゴルジ体の内腔に配向したトポロジーでゴルジ体膜に局在している [Paulsonら, *J. Biol. Chem.*, 264, 17615-17618 (1989)]。したがって、糖転移酵素のC-末端側を遺伝子改変すると、酵素活性を損なう場合が多い。そのため、上述したようにC-末端側に結合させないと機能しないGPIアンカーでは酵素活性を保持したまま糖転移酵素を細胞壁に固定化することが極めて困難である。これに対し、糖転移酵素のN-末端側には膜貫通領域があり、この部分で膜に局在しているため、この膜貫通領域を欠失させればゴルジ体に滞留することなく、細胞表面に分泌さ

れることが報告されている [Weinsteinら、J. Biol. Chem., 263, 17735-17743 (1987)]。したがって、この膜貫通領域を欠失させた糖転移酵素に他のシグナルを付加すれば糖転移酵素の局在性を操作する上で有効と考えられる。

【 0 0 0 7 】

P i r (protein internal repeat) タンパク質は、酵母細胞壁に共有結合している細胞壁タンパク質であり、数種類の互いにホモロジーのある遺伝子ファミリーを形成している [TOH-Eら、YEAST, 9, 481-494 (1993) ; Mrsaら、YEAST, 13, 1145-1154 (1997)]。しかし、細胞壁への局在と結合様式の詳細については不明である。塩や界面活性剤では溶出せず、アルカリ条件で細胞壁から離脱することから、G P I アンカータンパク質とは異なる局在及び結合様式で細胞壁に結合していると考えられる [Mrsaら、YEAST, 15, 813-820 (1999)]。

【 0 0 0 8 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、C-末端を遺伝子操作することにより活性が損なわれる糖転移酵素に代表されるタンパク質を、その活性を保持したまま酵母細胞壁表層に局在及び固定化し、これを固定化酵素として提供することを目的とする。

【 0 0 0 9 】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、酵母細胞壁の P i r タンパク質をコードする遺伝子の下流に、異種タンパク質をコードする遺伝子を結合させてなる融合遺伝子を含む融合遺伝子発現ベクターにて酵母を形質転換すれば、P i r タンパク質が異種タンパク質のN末端に結合した融合タンパク質が酵母細胞壁表層に発現し、しかも異種タンパク質の活性は維持されることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【 0 0 1 0 】

すなわち、以下の(1)～(3)の発明である。

(1) 以下の(a)又は(b)の酵母細胞壁タンパク質をコードする遺伝子の下流に、異種タンパク質をコードする遺伝子を結合させてなる融合遺伝子を含むことを特徴とする、融合遺伝子発現ベクター。

(a) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質

(b) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ酵母細胞壁への局在及び固定化能を有するタンパク質

【 0 0 1 1 】

(2) 上記 (1) の融合遺伝子発現ベクターにて形質転換された形質転換酵母

(3) 上記 (2) の形質転換酵母を培養し、融合遺伝子を酵母細胞壁表層に発現させ、異種タンパク質が細胞壁に固定化されている酵母を取得することを特徴とする、固定化酵素の製造方法。

【 0 0 1 2 】

なお、上記のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加は、出願前周知技術である部位特異的変異誘発法により実施することができ、また、1 若しくは数個のアミノ酸とは、部位特異的変異誘発法により欠失、置換若しくは付加できる程度の数のアミノ酸を意味する。

以下、本発明を詳細に説明する。

【 0 0 1 3 】

【発明の実施の形態】

本発明の融合遺伝子発現ベクターは、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する酵母の細胞壁に存在する P i r タンパク質をコードする遺伝子の下流に所望の酵素タンパク質遺伝子を結合させてなる融合遺伝子を含むものである。

【 0 0 1 4 】

本発明において用いる P I R 遺伝子は、具体的には、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の W303-1A (ura3, leu2, his3, trp1, ade2) [Kainumaら、Glyco biology, Vol. 9, 133 (1999)] 株から得たゲノムを鋳型にして PCR 法により取得することができる。プライマーには、P i r タンパク質をコードする部分を容易に切り出せるとともに、標識抗原遺伝子等を簡単に挿入できるのに便利な制限酵素切断部分を付与したものをを用いる。

【 0 0 1 5 】

また、上記PIR遺伝子の下流に結合させる所望の異種タンパク遺伝子としては、いかなるものでもよいが、例えば、C末端を遺伝子操作することにより活性が損なわれてしまう可能性のあるタンパク質、例えば糖転移酵素遺伝子が好適である。具体的には、ガラクトース転移酵素、フコース転移酵素、グルコース転移酵素、マンノース転移酵素、ガラクトサミン転移酵素、シアル酸転移酵素、N-アセチルグルコサミン転移酵素等を挙げることができる。

【0016】

PIR遺伝子の下流に所望の異種タンパク質遺伝子を結合させた融合遺伝子は、その上流にプロモーターを、下流にターミネーターを挿入して発現カセットを構築し、これを発現ベクターに導入する。あるいは、該融合遺伝子を導入する発現ベクターにプロモーターとターミネーターが既に存在する場合は、発現カセットを構築することなく、そのプロモーターとターミネーターを利用してその間に該融合遺伝子のみを導入すればよい。

【0017】

発現カセット中のプロモーターは、酵母発現系で一般に使用され、形質転換酵母菌内で導入した融合遺伝子を発現させることができるプロモーターであれば特に限定はないが、例えば、PGK、GAP、TPI、GAL1、GAL10、ADH2、PHO5、CUP1等が挙げられ、特にGAPプロモーターが好ましい。

一方、ターミネーターは、酵母発現系で一般に使用され、導入した融合遺伝子の下流に存在させて転写終結が可能とするものであればよく、例えば、ADH1、TDH1、TFF、TRP5等が挙げられる。

【0018】

発現カセットを導入する発現ベクターとしては、酵母発現系で一般に使用され、それにて形質転換した形質転換酵母菌の細胞壁表層に融合遺伝子を発現させることのできるものであれば特に限定はないが、酵母エピソード型発現ベクターが好適に使用されうる。

【0019】

酵母エピソード型プラスミドベクター (yeast episome plasmid vector) は、酵母の本来もつ2 μ プラスミドの配列を含んでおり、その複製起点を利用して宿

主酵母細胞内で複製できるようにしたベクターである。本発明で使用する酵母エピソード型発現ベクターは、酵母の2 μ プラスミド配列の少なくともARS 配列を含んでおり、かつ宿主酵母菌体内において染色体外で増殖することができれば特に限定はされない。例えば、YEp51、pYES2、YEp351、YEp352等が挙げられる。

【 0 0 2 0 】

上記の酵母エピソード型発現ベクターは、組換え大腸菌でのサブクローニングを行なえる様、大腸菌体内部で増殖できるシャトルベクターである方が好ましく、またアンピシリン耐性遺伝子等選択マーカー遺伝子を含むものがさらに好ましい。また、該発現ベクターは、組換え酵母を作成した際に、栄養要求性や薬剤耐性によって酵母クローンを選抜できる、マーカー遺伝子を含む。マーカー遺伝子としては、例えば、HIS3、TRP1、LEU2、URA3、ADE2、CAN1、SUC2、LYS2、CUP1等が挙げられる [大島泰治編著、生物化学実験法39、酵母分子遺伝学実験法、119-144 (1996)]。これらはあくまで例示であり、遺伝子導入の宿主とする酵母菌株の遺伝子型に応じて選択されるべきものである。

【 0 0 2 1 】

上述した融合遺伝子発現プラスミドの構築に関する一連の手法は、後記実施例の記載を参照して、あるいは慣用の技術により当業者が適宜実施することができる。

本発明において、上記の融合遺伝子発現ベクターにて形質転換させる宿主酵母としては、サッカロマイセス属、カンジダ属に属する酵母を用いるが、特に限定はされない。サッカロマイセス属の酵母としては、例えば、*Saccharomyces cerevisiae* KK4株、Y334株、Inv-Sc1株、W303株等が挙げられる。

融合遺伝子発現ベクターにて酵母を形質転換するには、例えば、リチウム酢酸法、エレクトロポレーション法等の公知の方法を利用できる [Becker and Guarente, *Methos Enzymol.*, 194, 182-187 (1991)]。

【 0 0 2 2 】

形質転換酵母のスクリーニングのために、適当な選択マーカーを用いる。一例として、宿主細胞の染色体DNA上の代謝に関与する遺伝子を用いることが望ましい。すなわち、染色体DNA上の上記遺伝子を突然変異等の適当な手段により機能

しないような宿主細胞を用い、相当する正常な遺伝子を含む発現ベクターを形質転換することにより、正常な代謝遺伝子を含む形質転換細胞のみを増殖させてスクリーニングできる物が好ましい。具体的には上記したようなURA3、LEU2等広く用いられている選択マーカー遺伝子を発現ベクターに接続する。染色体組み込み型タイプ（YIpタイプ）の場合にもこれらの遺伝子はスクリーニングのマーカーとなる。

【 0 0 2 3 】

形質転換された形質転換酵母を培養すると、P i r タンパク質が所望のタンパク質のN末端に結合した融合タンパク質を該細胞の細胞壁表層に発現させることができる。所望のタンパク質は、P i r を介して形質転換酵母の細胞壁表層に固定化されているので、当該形質転換酵母はそのまま固定化酵素として利用できる。

形質転換酵母の培養方法は、酵母の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

【 0 0 2 4 】

培地としては、酵母が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地を用いる。例えば、Difco社から供給される各種の培地成分を添加し、かつプラスミドの複製・保持に必要なマーカーによって供給可能となるアミノ酸を除いた合成培地（炭素源、窒素源、無機塩類、アミノ酸、ビタミン等を含む）等を利用できる [Sherman, Methos Ensymol., 194, 3-57 (1991)]。

培地のpHは、6～8に調節することが適当である。pHの調整は、無機又は有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

培養は、28～32℃、好ましくは30℃で、15～48時間、通気や攪拌を加えて行う。

【 0 0 2 5 】

【実施例】

次に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

〔実施例 1〕 (出芽酵母 P I R 1 遺伝子のクローニング)

出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の W303-1A (ura3, leu2, his3, trp1, ade2) [Kainuma ら、Glycobiology, Vol. 9, 133 (1999)] 株から得たゲノムを鋳型にして PCR 法により P I R 1 遺伝子の単離を行った。

【 0 0 2 6 】

プライマーはデータベース上に登録されている塩基配列 (DB 名 : GenBank ; アクセス : D13740) に基づいて設計した。その際に、タンパク質をコードしている部分が制限酵素を用いて容易に切り出せるとともに、標識抗原遺伝子等が簡単に挿入できるように、N-末端部分に SacI 部位、C-末端部分に NotI 部位をあらかじめ含んだプライマーを設計した。それぞれのプライマーの塩基配列を以下に示す。

【 0 0 2 7 】

フォワードプライマー :

5'-GGGGGGAGCTCATGC AATACAAAAATCATTAGTTGCCTCCGCC-3'

(配列番号 2)

リバースプライマー :

5'-CCCCCGCGGCGCAGTGCAAATCGATAGC

(配列番号 3)

【 0 0 2 8 】

ここでフォワードプライマーの塩基配列中の下線部分は SacI 部位を示し、リバースプライマーの塩基配列中の下線部分は NotI 部位を示す。このようにして設計したプライマーは常法により合成した。

PCR 溶液の組成は以下の表 1 に示す。

【 0 0 2 9 】

【表 1】

PCR溶液の組成	
10×ExpandHFバッファー (15mM MgCl ₂ を含む)	10 μ l
dNTP Mixture (各2.5mM)	8 μ l
フォワードプライマー (20pmol/ μ l)	2 μ l
リバースプライマー (20pmol/ μ l)	2 μ l
ゲノムDNA	3 μ l
Expand™ High Fidelity PCRSystem 酵素ミックス	0.75 μ l
水	74.25 μ l
合計	100 μ l

【0030】

また、PCRの温度条件は、94℃で2分鋳型DNAを変性し、94℃で15秒（変性）、50℃で30秒（アニーリング）、72℃で1分（伸長）に加えてサイクル当たり5秒間の延長、この反応を25サイクル行う。最後に72℃で7分間伸長する。このPCRによって得られた約1kbpのDNA増幅断片をNotI-SacIで切りだし、pBluescript II SK(-) (stratagen) のNotI-SacI部位に挿入してpBSII(PIR1) (pAB2) を構築した。

【0031】

【実施例 2】 (分裂酵母HA-gma12融合遺伝子の構築)

分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) のgma12遺伝子 (DB名: GenBank; アクセッション番号: Z30917) [Chappell, Mol. Biol. Cell, 5, 519-528 (1994)] もまたPCRを用いてクローニングした。PCR溶液の組成は表 2 に示す。

【0032】

【表2】

PCR溶液の組成

10×ExpandHFバッファー (15mM MgCl ₂ を含む)	10 μ l
dNTP Mixture (各2.5mM)	8 μ l
フォワードプライマー (20pmol/ μ l)	2 μ l
リバースプライマー (20pmol/ μ l)	2 μ l
プラスミドDNA	1 μ l
Expand™ High Fidelity PCR System 酵素ミックス	0.75 μ l
水	76.25 μ l
合計	100 μ l

【0033】

YEpU-GAP-gma12 [YOKO-0ら、Eur.J.Biochem., Vol. 257, 630-637 (1998)] を鋳型に用い、プライマーはGma12タンパク質のN-末端側にある膜貫通領域を除いて増幅できるように設計し、増幅産物のN-末端側にSalI、C-末端側にXhoI部位をあらかじめ含むようにした。以下の塩基配列を有するプライマーを用いた。

【0034】

フォワードプライマー：

5'-GGGGGGTCGACAGCCCCGATACCAAGCTTCAAACGAAGATG

(配列番号4)

リバースプライマー：

5'-GGGGCTCGAGCTAGGATGATGGTTTCAAAGATTTTGAATATGATCC

(配列番号5)

【0035】

ここで、フォワードプライマーの塩基配列中の下線部はSalI部位を示し、リバースプライマーの塩基配列中の下線部分はXhoI部位を示す。またPCRの温度条件は、PIR1をPCRにて増幅した際に用いた条件と同じ条件で行った。

次いで、gma12遺伝子をpBluescript II SK(-) (stratagen) のSalI-XhoI部位に挿入し、さらにインフレームになるように3×HA標識抗原遺伝子をNotI-SalI部位に挿入してpBSII(HA-gma12) (pAB1)を構築した。

【 0 0 3 6 】

〔実施例 3〕 (PIR1-HA-gma12融合遺伝子の作製及び融合遺伝子発現ベクターの作製、並びにこのプラスミドを含む酵母形質転換体の作製)

pBSII(PIR1)に挿入にされているPIR1遺伝子をSacI-NotIで切りだし、pBSII(HA-gma12)のSacI-NotI部位に挿入し、pBSII(PIR1-HA-gma12) (pAB3) を構築した。

このpBSII(PIR1-HA-gma12)からPIR1-HA-gma12融合遺伝子のC-末端側にSmaI部位を付加するため以下の塩基配列を有するプライマーを用いてPCR法により遺伝子を増幅した。

【 0 0 3 7 】

フォワードプライマー：

5'-GGGGGGAGCTCATGCAATACAAAAATCATTAGTTGCCTCCGCC-3'

(配列番号 2)

リバースプライマー：

5'-GGGGCCCGGGCTAGGATGATGGTTTCAAAGATTTTGAATATGATCC-3'

(配列番号 6)

【 0 0 3 8 】

ここで、フォワードプライマーの塩基配列中の下線部はSacI部位を示し、リバースプライマーの塩基配列中の下線部分はSmaI部位を示す。

この増幅産物をSacI-SmaIで切り出した後、酵母の発現ベクターYEp352GAP [Royら、J. Biol. Chem. , Vol. 237, 2538 (1998)] のマルチクローニング部位をpUC18のマルチクローニング部位のうちのEcoRIからSalIまでの部分でさしかえた発現用ベクターYEp352GAP-II (Nakayama) のSacI-SmaI部位に挿入してYEp352GAP-II(PIR1-HA-gma12) (pAB4) を構築した (図 1) 。

【 0 0 3 9 】

発現ベクター YEp352GAP-II(PIR1-HA-gma12) は酵母W303-1A株 (ura3, leu2, his3, trp1, ade2) [Kainumaら、Glycobiology, Vol. 9, 133 (1999)] に形質転換し、W303- YEp352GAP-II(PIR1-HA-gma12) 株を得た。

なお、上記W303- YEp352GAP-II(PIR1-HA-gma12) 株は、平成12年11月16日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所に、FERM P-18125として寄託されている。

【0040】

【実施例4】 (Pir1-HA-Gma12融合タンパク質の酵母細胞内での発現)

実施例3で得られた形質転換体について、細胞内で融合遺伝子が発現し、融合タンパク質が酵母細胞表層に提示されているかどうかを間接蛍光抗体法にて調べた。

まず、上記形質転換体W303-YEp352GAP-II(PIR1-HA-gma12)株とコントロールとして空の発現ベクターをW303株に形質転換したW303-YEp352GAP-II株をSD(-ウラシル)液体培地5mlでOD600=5まで培養(約30時間)し、培養液1mlを回収し細胞をPBS[8mg/ml NaCl、0.2mg/ml KCl、1.44mg/ml Na₂HPO₄、0.2mg/ml (pH7.4)]で洗った。細胞を回収し、1μgのHA抗体[Anti-HA High Affinity (Roche)]を含むPBS溶液[8mg/ml NaCl、0.2mg/ml KCl、1.44mg/ml Na₂HPO₄、0.2mg/ml (pH7.4)、1mg/ml BSA]250μlに懸濁し、30分間氷上でインキュベートした。細胞を回収しPBS溶液で一回洗った後、1μgの標識二次抗体[Alexa FluorTM 546 goat anti-rat IgG (H+L) conjugate (Molecular Probe)]を含むPBS溶液[8mg/ml NaCl、0.2mg/ml KCl、1.44mg/ml Na₂HPO₄、0.24mg/ml KH₂PO₄ (pH7.4)、1mg/ml BSA]250μlに懸濁し、遮光して30分間氷上でインキュベートした。それぞれの30分間のインキュベーションの際に細胞と抗体溶液がよく混ざるようにときどき転倒法にて混ぜあわせた。細胞を回収し、PBSで2回洗った後、40μlのPBSに懸濁し細胞を蛍光顕微鏡にて観察した(図2)。

その結果、W303-YEp352GAP-II(PIR1-HA-gma12)株でPir1-HA-Gma12融合タンパク質が細胞表層で発現していることが確認された。

【0041】

【実施例5】 (ガラクトース転移酵素活性の測定)

ガラクトース転移酵素活性測定は、Yoko-oらの方法を参考に行った[Yoko-oら、Eur. J. Biochem., 257, 630-637 (1998)]。酵素源としては実施例3で作製した酵母細胞[W303-Yp352GAP-II(PIR1-HA-gma12)]自体を用いた。アクセプターとしてPA化したマンノピオース、基質としてUDP-ガラクトースを用いた。反応液[100mM HEPES (pH7.2)、1mM MnCl₂、5mM UDP-ガラクトース、300pmol PA化マンノピオース]20μlに細胞懸濁液11μlを加え、37℃で5時間インキュベ

ートした。細胞懸濁液はOD600=6の培養液を1ml分を回収し、洗浄バッファー [10 mM Tris-HCl (pH8)、1mM PMSF] で2回洗った後、11 μ lの洗浄バッファーに懸濁したものを用いた。次いで、この反応液に30 μ lの氷冷した水を加えた後、沈殿した細胞を3000rpmで3分間遠心して取り除き、上清をウルトラフリー (0.22 μ m) で分子量10,000以上のものを取り除き、HPLCによりマンノピオースとガラクトシルマンノピオースの測定を行った。HPLCはAmide-80カラム (TSK gel Amide-80、東ソー、直径0.46cm×長さ25cm) を用いた。200 mM 酢酸トリエチルアミン緩衝液 (pH 7.0) とアセトニトリルとの10:90の混合液 (A液)、200 mM 酢酸トリエチルアミン緩衝液 (pH 7.0) とアセトニトリルとの60:40の混合液 (B液) を調製した。予め溶媒Aを流速1.0 ml/minで流すことによりカラムを平衡化し、試料注入直後から溶媒Bの割合を60分かけて100%まで直線的に上昇させ、PA化オリゴ糖を溶出した。

【 0 0 4 2 】

その結果、Pir1-HA-gma12の融合タンパク質を発現することができるW303-YEp352GAP-II (PIR1-HA-gma12) 株でのみガラクトース転移酵素活性を検出した (図3) 。融合タンパク質を発現しない W303-YEp352GAP-II株ではガラクトース転移酵素活性は検出されなかった。

【 0 0 4 3 】

〔実施例6〕 (PIR1-HA-FUT6融合遺伝子の作製及び融合遺伝子発現ベクターの作製、並びにこのプラスミドを含む酵母形質転換体の作製)

ヒトの α -1,3-FUTであるFUT6遺伝子 (DB名: GenBank; アクセッション: L01698) [Weston, J. Biol. Chem., 267, 24575-24585 (1992)] のアミノ酸コード領域を含むプラスミドpBS(SK-) / FT6H1.3 (創価大学の成松教授より供与) を鋳型に用い、プライマーはFUT6タンパク質のN-末端側にある膜貫通領域を除いて増幅できるように設計し、N-末端側にSalI、C-末端側にXhoI部位をあらかじめ含むようにした。以下の塩基配列を有するプライマーを用いた。

【 0 0 4 4 】

フォワードプライマー:

5'-CCCGTCGACAATCCTATCTGCGTGTGTCTCAAGAC-3'

(配列番号 7)

リバースプライマー:

5'-CCCCTCGAGTCAGGTGAACCAAGCCGCTATGCCGC-3'

(配列番号 8)

【 0 0 4 5 】

ここでフォワードプライマーの塩基配列中の下線部はSalIを示し、リバースプライマーの塩基配列中の下線部分はXhoI部位を示す。PCRの際に用いた反応溶液の組成及び反応条件は実施例 1 の表 2 と実施例 1 の反応条件に従って行った。増幅された約1kbの断片をpBSII(PIR1-HA-gma12) (pAB3) のSalI-XhoI部位にインフレームになるように挿入してpBSII(PIR1-HA-FUT6) (pAB7)を構築した。このpBSII(PIR1-HA-FUT6)からPIR1-HA-FUT6部分SacI-XhoIで切りだし、Blunting high (TOYOBO) で平滑化した後、発現用ベクターYEpl352GAP-II (Nakayama) のSmaI部位に挿入し、YEpl352GAP-II(PIR1-HA-FUT6) (pAB9) を構築した(図 4)。

【 0 0 4 6 】

この発現ベクター YEpl352GAP-II(PIR1-HA-FUT6) は酵母W303-1A株 (ura3, leu2, his3, trp1, ade2) [Kainumaら、Glycobiology, Vol. 9, 133 (1999)] に形質転換し、W303- YEpl352GAP-II(PIR1-HA-FUT6) 株を得た。

なお、上記W303- YEpl352GAP-II(PIR1-HA-FUT6)株は、平成12年11月16日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所に、FERM P- 18124として寄託されている。

【 0 0 4 7 】

〔実施例 7〕 (Pir1-HA-FUT 6 融合タンパク質の酵母細胞内での発現)

実施例 6 で得られた形質転換体について、細胞内で融合遺伝子が発現し、融合タンパク質が酵母細胞表層に提示されているかどうかを間接蛍光抗体法にて調べた。

まず、上記形質転換体W303- YEpl352GAP-II(PIR1-HA-FUT6) 株とコントロールとして空の発現ベクターをW303株に形質転換したW303-YEpl352GAP-II株をSD (-ウラシル) 液体培地5mlでOD600=5まで培養(約30時間)し、培養液1mlを回収し、細胞をPBS [8mg / ml NaCl、0.2mg / ml KCl、1.44mg / ml Na₂HPO₄、0.24mg / ml KH₂PO₄ (pH7.4)] で洗った。細胞を回収し、1μgのHA抗体 [Anti-HA High A

finity (Roche)] を含むPBS溶液 [8mg / ml NaCl、0.2mg / ml KCl、1.44mg / ml Na_2HPO_4 、0.24mg / ml KH_2PO_4 (pH7.4)、1mg / ml BSA] 250 μl に懸濁し、遮光して30分間氷上でインキュベートした。それぞれの細胞を回収しPBS溶液で一回洗った後、1 μg の標識二次抗体 [Alexa FluorTM 546 goat anti-rat IgG (H+L) conjugate (Molecular Probe)] を含むPBS溶液 [8mg / ml NaCl、0.2mg / ml KCl、1.44mg / ml Na_2HPO_4 、0.24mg / ml KH_2PO_4 (pH7.4)、1mg / ml BSA] 250 μl に懸濁し、遮光して30分間氷上でインキュベートした。それぞれの30分間のインキュベーションの際に細胞と抗体溶液がよく混ざるようにときどき転倒法にて混ぜあわせた。細胞を回収し、PBSで2回洗った後、40 μl のPBSに懸濁し細胞を蛍光顕微鏡にて観察した (図5)。

その結果、W303- YEp352GAP-II (PIR1-HA-FUT6) 株でPir1-HA-FUT6融合タンパク質が表層で発現していることが確認された。

【0048】

【実施例8】 (フコース転移酵素活性の測定)

フコース転移酵素活性測定は、グライコバイオロジー実験プロトコール (谷口ら監修, 156-159 (1996)) を参考に行った。酵素源としては実施例6で作製した酵母細胞 [W303-YEp352GAP-II (PIR1-HA-FUT6)] を洗浄バッファー中 [10mM Tris-HCl (pH8)、1mM PMSF] でガラスビーズにより破碎した細胞破碎液を用いた。アクセプターとしてPA化したLacto-N-neotetraose、基質としてGDP-フコースを用いた。反応液 [50mM Cacodylate buffer (pH 6.8)、5mM ATP、25mM MnCl_2 、0.075mM GDP-フコース、0.075mM PA化Lacto-N-neotetraose] 4.5 μl に細胞破碎液5.5 μl を加え、37℃で5時間インキュベートした。細胞懸濁液はOD600 = 6の培養液を0.25ml分回収し、洗浄バッファー [10mM Tris-HCl (pH 8)、1mM PMSF] で2回洗った後、ガラスビーズにて破碎した細胞破碎液を用いた。次いで、この反応を停止させるために98℃で3分間インキュベートした後、反応液に40 μl の氷冷した水を加えた後、沈殿した細胞を3000rpmで3分間遠心して取り除き、上清をウルトラフリー (0.22 μm) で分子量10,000以上のものを取り除き、HPLCによりLacto-N-neotetraoseとLacto-N-fucopentaoseの測定を行った。HPLCはAmide-80カラム (TSK gel Amide-80、東ソー、直径0.46cm×長さ25cm) を用いた。

200 mM酢酸－トリエチルアミン緩衝液 (pH 7.0) とアセトニトリルとの10:90の混合液 (A液)、200 mM酢酸－トリエチルアミン緩衝液 (pH 7.0) とアセトニトリルとの60:40の混合液 (B液) を調製した。予め溶媒Aを流速1.0 ml/minで流すことによりカラムを平衡化し、試料注入直後から溶媒Bの割合を60分かけて100%まで直線的に上昇させ、PA化オリゴ糖を溶出した。

【0049】

その結果、Pir1-HA-FUT6の融合タンパク質を発現することができる、W303-YEp352GAP-II (PIR1-HA-FUT6) 株でのみフコース転移酵素活性を検出した (図6)。融合タンパク質を発現しない W303-YEp352GAP-II株ではフコース転移酵素活性は検出されなかった。このことから、PIR1を使えば糖転移酵素を酵母細胞表層に提示することが可能であることが明らかとなった。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願は、参照によりその全体を本明細書に組み入れるものとする。

【0050】

【発明の効果】

本発明によれば、糖転移酵素等の有用タンパク質をその酵素活性を損なうことなく酵母細胞表面に固定化し、これを固定化酵素として提供することができる。従って、酵素を精製する過程や酵素のビーズへの固定化の過程は省略できるので、極めて簡便にかつ大量に固定化酵素を製造することができる。

【0051】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Secretary of Agency of Industrial Science and Technology

<120> Expression vector for fused gene and Method for producing immobilized enzyme

<130> 11900381

<160> 8

<170> Patent in Ver. 2.0

<210> 1

<211> 341

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 1

Met Gln Tyr Lys Lys Ser Leu Val Ala Ser Ala Leu Val Ala Thr Ser

1

5

10

15

Leu Ala Ala Tyr Ala Pro Lys Asp Pro Trp Ser Thr Leu Thr Pro Ser

20

25

30

Ala Thr Tyr Lys Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ser Ser Thr Phe Gly Ile

35

40

45

Ala Val Glu Pro Ile Ala Thr Thr Ala Ser Ser Lys Ala Lys Arg Ala

50

55

60

Ala Ala Ile Ser Gln Ile Gly Asp Gly Gln Ile Gln Ala Thr Thr Lys

65

70

75

80

Thr Thr Ala Ala Ala Val Ser Gln Ile Gly Asp Gly Gln Ile Gln Ala

85

90

95

Thr Thr Lys Thr Lys Ala Ala Ala Val Ser Gln Ile Gly Asp Gly Gln
100 105 110

Ile Gln Ala Thr Thr Lys Thr Thr Ser Ala Lys Thr Thr Ala Ala Ala
115 120 125

Val Ser Gln Ile Gly Asp Gly Gln Ile Gln Ala Thr Thr Lys Thr Lys
130 135 140

Ala Ala Ala Val Ser Gln Ile Gly Asp Gly Gln Ile Gln Ala Thr Thr
145 150 155 160

Lys Thr Thr Ala Ala Ala Val Ser Gln Ile Gly Asp Gly Gln Ile Gln
165 170 175

Ala Thr Thr Lys Thr Thr Ala Ala Ala Val Ser Gln Ile Gly Asp Gly
180 185 190

Gln Ile Gln Ala Thr Thr Asn Thr Thr Val Ala Pro Val Ser Gln Ile
195 200 205

Thr Asp Gly Gln Ile Gln Ala Thr Thr Leu Thr Ser Ala Thr Ile Ile
210 215 220

Pro Ser Pro Ala Pro Ala Pro Ile Thr Asn Gly Thr Asp Pro Val Thr
225 230 235 240

Ala Glu Thr Cys Lys Ser Ser Gly Thr Leu Glu Met Asn Leu Lys Gly
245 250 255

Gly Ile Leu Thr Asp Gly Lys Gly Arg Ile Gly Ser Ile Val Ala Asn

260

265

270

Arg Gln Phe Gln Phe Asp Gly Pro Pro Pro Gln Ala Gly Ala Ile Tyr

275

280

285

Ala Ala Gly Trp Ser Ile Thr Pro Glu Gly Asn Leu Ala Ile Gly Asp

290

295

300

Gln Asp Thr Phe Tyr Gln Cys Leu Ser Gly Asn Phe Tyr Asn Leu Tyr

305

310

315

320

Asp Glu His Ile Gly Thr Gln Cys Asn Ala Val His Leu Gln Ala Ile

325

330

335

Asp Leu Leu Asn Cys

340

<210> 2

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

ggggggagct catgcaatac aaaaaatcat tagttgcctc cgcc

44

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

cccccgcggc cgcacagtgc aaatcgatag c

31

<210> 4

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

ggggggtcga cagcccgata ccaagcttca aacgaagatg

40

<210> 5

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

ggggctcgag ctaggatgat ggtttcaaaa gattttgaat atgatcc

47

<210> 6

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

ggggcccggg ctaggatgat ggtttcaaaa gattttgaat atgatcc

47

<210> 7

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

cccgtcgaca atcctatctg cgtgtgtctc aagac

45

<210> 8

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

cccctcgagt caggtgaacc aagccgctat gccgc

45

【図面の簡単な説明】

【図 1】

YE_p352GAP-II(PIR1-HA-gma12) (pAB4) の構造を示す。

【図 2】

形質転換体W303-YE_p352GAP-II(PIR1-HA-gma12) 株とコントロールのW303-YE_p352GAP-II株について、融合タンパク質発現を蛍光抗体法にて検出した結果を示す。

【図 3】

形質転換体W303-YE_p352GAP-II(PIR1-HA-gma12) 株とコントロールのW303-YE_p352GAP-II株について、ガラクトース転移酵素活性を検出した結果を示す。図中の矢頭はガラクトシルマンノピオースのピークを示す。

【図 4】

YE_p352GAP-II(PIR1-HA-FUT6) (pAB9) の構造を示す。

【図 5】

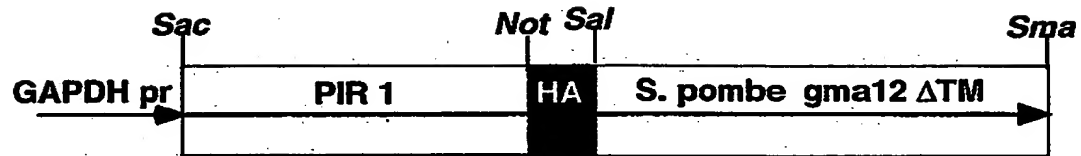
形質転換体 W303- YEp352GAP-II (PIR1-HA-FUT6) 株とコントロールの W303-YEp352GAP-II 株について、融合タンパク質発現を蛍光抗体法にて検出した結果を示す。

【図 6】

形質転換体 W303- YEp352GAP-II (PIR1-HA-FUT6) 株とコントロールの W303-YEp352GAP-II 株について、フコース転移酵素活性を検出した結果を示す。図中の矢頭は Lacto-N-fucopentaose のピークを示す。

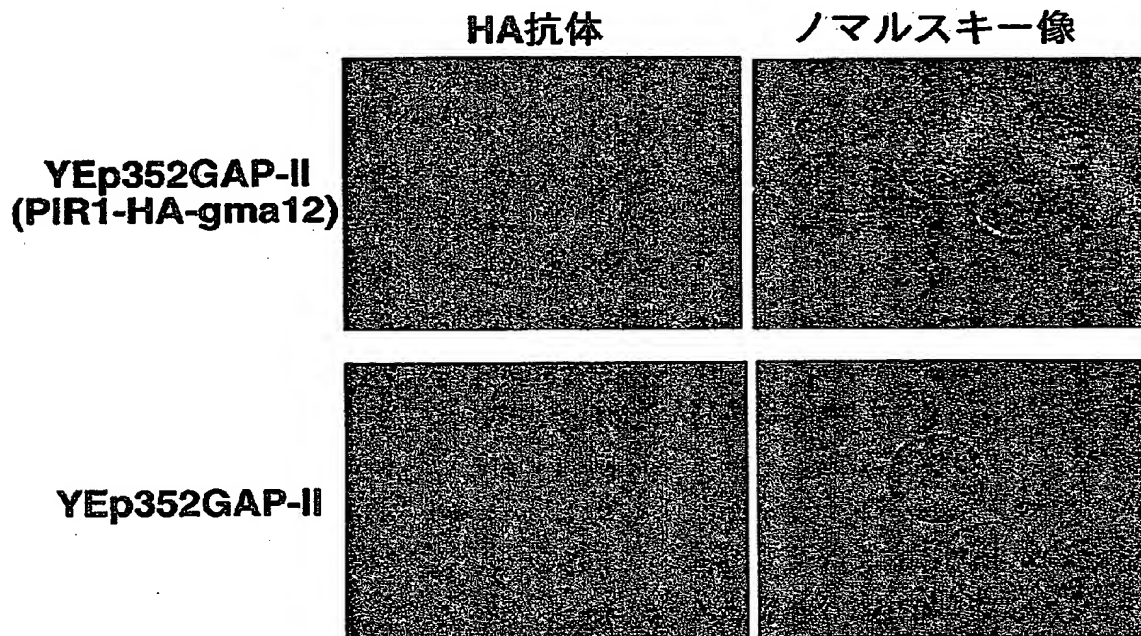
【書類名】 図面

【図 1】

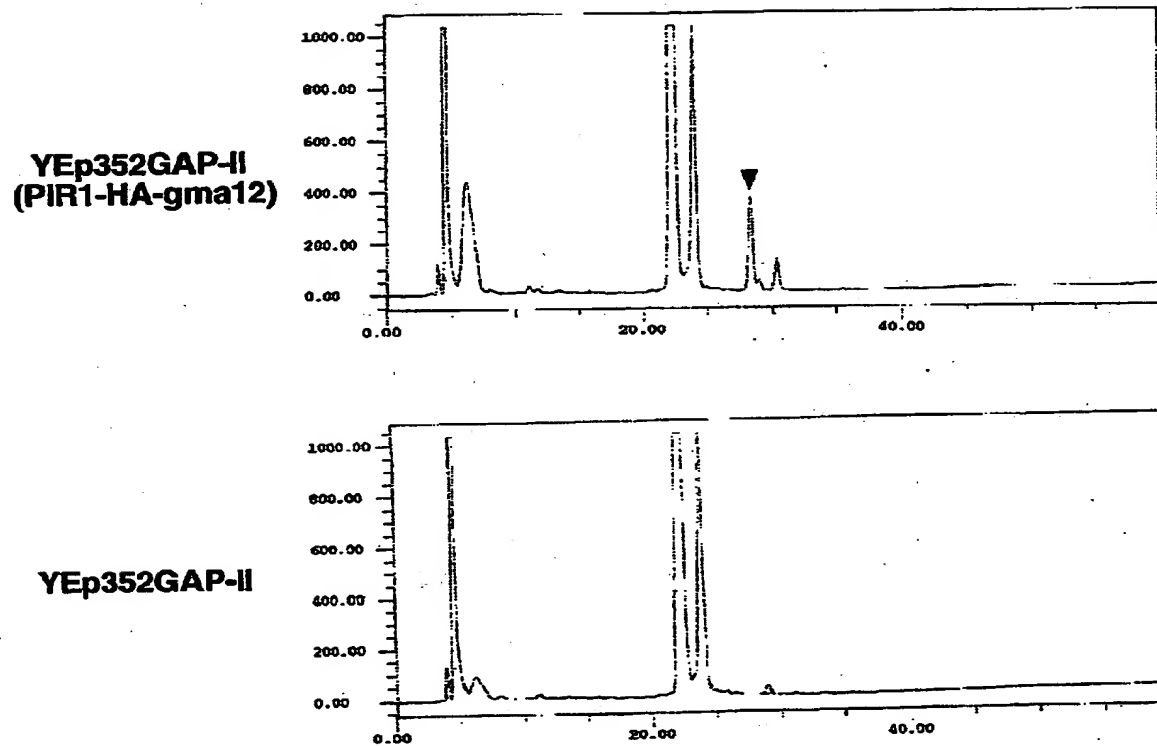


YEp352GAP-II(PIR1-HA-gma12)

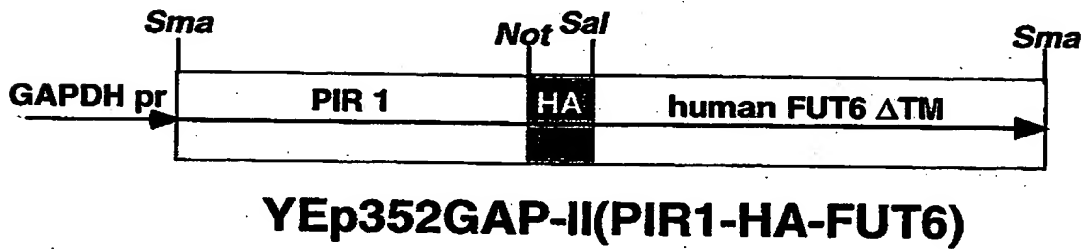
【図 2】



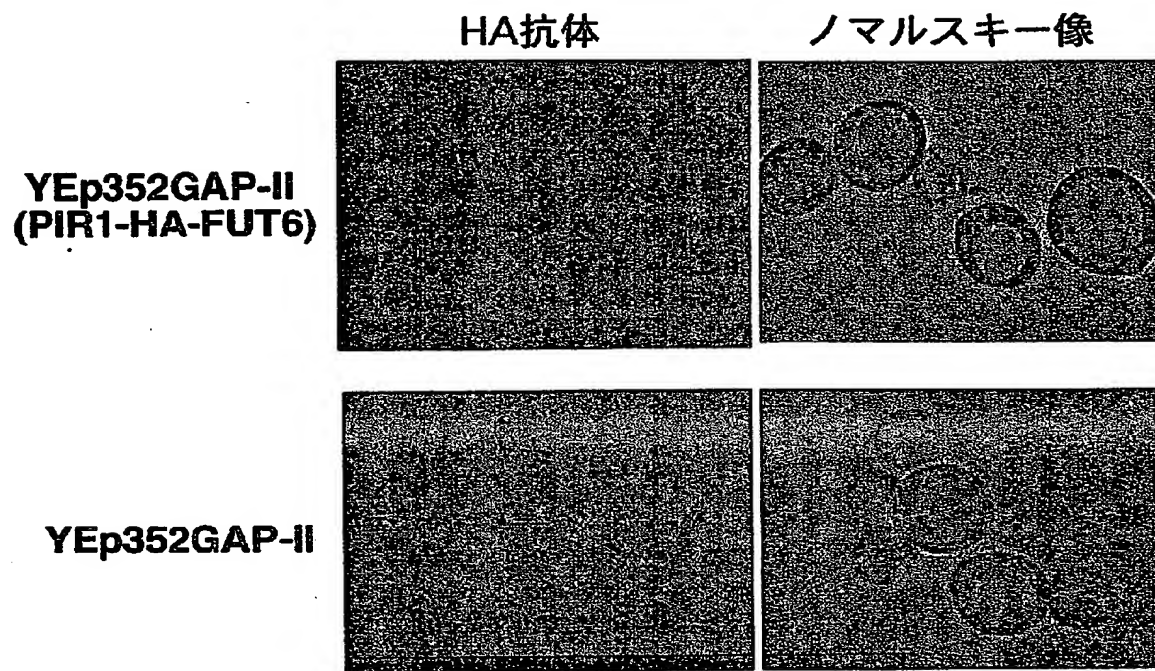
【図 3】



【図 4】

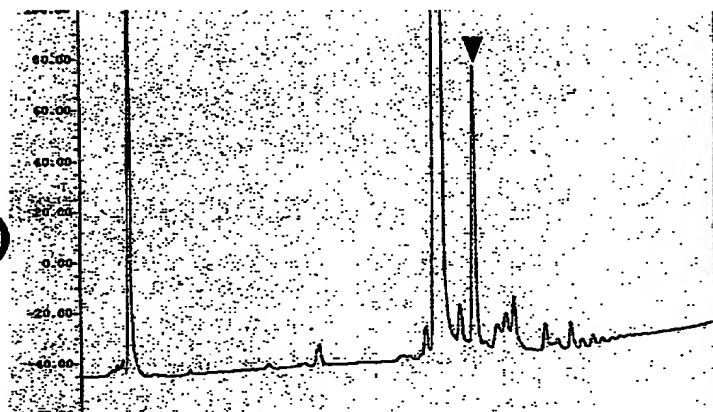


【図 5】

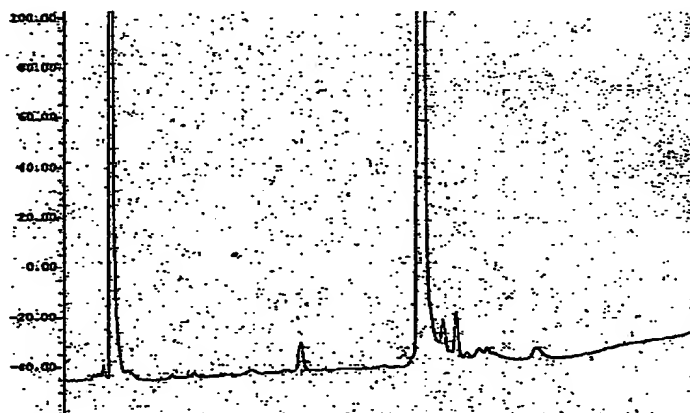


【図6】

**YEp352GAP-II
(PIR1-HA-FUT6)**



YEp352GAP-II



【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 酵母細胞壁タンパク質をコードする遺伝子の下流に、異種タンパク質をコードする遺伝子を結合させてなる融合遺伝子を含むことを特徴とする、融合遺伝子発現ベクター、該融合遺伝子発現ベクターにて形質転換された形質転換酵母、及び該形質転換酵母を培養し、融合遺伝子を酵母細胞壁表層に発現させ、異種タンパク質が細胞壁に固定化されている酵母を取得することを特徴とする、固定化酵素の製造方法。

【効果】 本発明によれば、糖転移酵素等の有用タンパク質をその酵素活性を損なうことなく酵母細胞表面に固定化し、これを固定化酵素として提供することができる。従って、酵素を精製する過程や酵素のビーズへの固定化の過程は省略できるので、極めて簡便にかつ大量に固定化酵素を製造することができる。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2000-354396
受付番号	50001500399
書類名	特許願
担当官	寺内 文男 7068
作成日	平成 12 年 11 月 27 日

< 認定情報・付加情報 >

【特許出願人】

【識別番号】	000001144
【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関 1 丁目 3 番 1 号
【氏名又は名称】	工業技術院長

【指定代理人】

【識別番号】	220000404
【住所又は居所】	茨城県つくば市東 1-1-3
【氏名又は名称】	工業技術院生命工学工業技術研究所長

【書類名】 出願人名義変更届（一般承継）
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2000-354396
【承継人】
【識別番号】 301000011
【住所又は居所】 東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1
【氏名又は名称】 経済産業省産業技術総合研究所長 日下 一正
【連絡先】 部署名 経済産業省産業技術総合研究所
筑波研究支援総合事務所特許管理課
担当者 楠本 眞 電話番号 0 2 9 8 - 6
1 - 2 1 7 9
【プルーフの要否】 要

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-354396
受付番号	50100196729
書類名	出願人名義変更届（一般承継）
担当官	寺内 文男 7068
作成日	平成13年 2月22日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成13年 2月13日
【承継人】	申請人
【識別番号】	301000011
【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関1丁目3番1号
【氏名又は名称】	経済産業省産業技術総合研究所長

【書類名】 出願人名義変更届（一般承継）
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2000-354396
【承継人】
【識別番号】 301021533
【住所又は居所】 東京都千代田区霞が関1-3-1
【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所
【代表者】 吉川弘之
【連絡先】 部署名 独立行政法人産業技術総合研究所
知的財産部知的財産管理室 担当者
楠本 眞 電話番号 0298-61-3
281
【ブルーフの要否】 要

特2000-354396

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-354396
受付番号	50100911002
書類名	出願人名義変更届（一般承継）
担当官	東海 明美 7069
作成日	平成13年 9月28日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成13年 6月22日

次頁無

【書類名】 出願人名義変更届（一般承継）
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
 【出願番号】 特願2000-354396
【承継人】
 【識別番号】 301021533
 【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所
 【代表者】 吉川 弘之
 【連絡先】 部署名 独立行政法人産業技術総合研究所
 知的財産部知的財産管理室
 担当者 長山 隆久
 電話番号 0 2 9 8 - 6 1 - 3 2 8 2
【提出物件の目録】
 【物件名】 権利の承継を証明する書面 1
 【援用の表示】 平成6年特許願第39472号
【プルーフの要否】 要

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-354396
受付番号	50101456593
書類名	出願人名義変更届（一般承継）
担当官	東海 明美 7069
作成日	平成13年10月 5日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成13年10月 2日

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001144]

1. 変更年月日 1990年 9月20日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号
氏 名 工業技術院長

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[301000011]

1. 変更年月日 2001年 1月 4日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号
氏 名 経済産業省産業技術総合研究所長

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [301021533]

1. 変更年月日 2001年 4月 2日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都千代田区霞が関1-3-1
氏 名 独立行政法人産業技術総合研究所